

## 拮抗菌の製剤化に向けての培養基, 導入媒体, および分散媒の検討

渡 辺 直 道

(1994年9月29日受理)

## Investigation of culture media, carrier media, and dispersing agents for formulation of antagonistic fungi

Naomichi WATANABE

### Summary

Mass production of antagonistic fungi is required for the practical application of biocontrol agents. Suitable culture media and carrier media must be developed for this purpose. In addition, they must be formulated with a view to storage, preservation, transportation and ease of handling. Thus, after investigating the suitability of 15 kinds of amino acid as culture media using 4 types of the antagonistic fungus *Gliocladium spp.*, it was found that isoleucine was best suited as a nitrogen source. Investigation on the carbon sources of antagonistic fungi using the above 4 types of fungi and 6 kinds of sugar indicated that inulin was suitable, while in tests on 2 types of *Trichoderma* and 8 kinds of sugar with the same objective, sucrose was most suitable. Next, in tests on carrier media using 13 types of *Trichoderma*, it was found that rice bran and wheat bran contained enough nutrient for the fungi, and combinations of rice bran or wheat bran with leaf mold, sawdust, rice straw, and peat moss were suitable as carrier media. As regards the formulation and survival rate of antagonistic fungi, when samples of 5 types of *Trichoderma* fungus were tested, it was found that the formulation of clay pellets with added organic material showed a high survival rate. Meanwhile, with regard to dispersing agent of lyophilization, tests using 2 types of *Trichoderma* fungus and 1 types of *Gliocladium* fungus showed that the mixed combinations of D sorbitol, skim milk and sodium L-glutamate had a high survival rate common to all three fungus stocks, and these were the most suitable dispersion media for lyophilization formulation.

**Key words:** Biological control, Biocontrol agents, Antagonistic fungi, formulation

### 緒 言

1975年に Backman ら<sup>1)</sup>は黒色糖蜜と珪藻土を供試して粒子状の生物防除剤を作成した。以後、拮抗菌の製剤化への試み<sup>2)5)8)9)</sup>は1970年代後期より盛んになり、特に大量生産に必要な培養基<sup>20)</sup>及び導入媒体<sup>11)12)13)</sup>の適正素材についての研究が行われ、製剤化された生物防除剤の土壌

へ施用後の追跡調査<sup>10)15)19)</sup>も行われた。また拮抗菌を直接種子処理<sup>7)14)</sup>する方法も考案されている。

国内では大島<sup>15)</sup>は *T. lignorum* を用い、雪花菜（おから）状の製剤を作成して、これをピンホールを設けたポリエチレン袋に保存した結果、30℃で7ヶ月間、室温で2年8ヶ月間生存した。また中沢ら<sup>17)</sup>は *Trichoderma* 菌をバーミキュライトで製剤化してリンゴ白紋羽病の生物防除試験を行った。現在市販されている製剤は大島が考案し、山陽薬品株式会社が製造したものであるが、効力の面を見ても充分ではないので、この製品は未完成であり、従って今後、研究を進める必要があると考えている。拮抗菌を製剤化することは嵩を少なくし取扱いを容易にするために重要なことである。生物防除剤を手軽に使用するためには粒剤、粉剤、錠剤などに製剤化することが必要である。生物防除剤を実用化するには、防除効果があり低廉な価格で、そして簡便に使用でき、貯蔵、保存、運送が容易でなければならない。これらの問題を解決しなければ生物防除剤は実用化できない。

本研究で供試した *Gliocladium* と *Trichoderma* は分類上、Deuteromycotina 綱、Hyphomycetes 目、Moniliaceae 科まで同じで、属の異なった糸状菌性拮抗菌で培養的性質および拮抗作用の機作が非常に似ており、製剤化のための培養基や導入媒体の素材を検討するとき、いずれの菌を使用しても、その結果は他方に応用できると考えている。この研究の目的は拮抗菌の培養基に最適な炭素源および窒素源の探索、また導入媒体の適正素材の探索、そして製剤化と拮抗菌の生残率について調査を行うことである。

## 材 料 と 方 法

### 1. 拮抗菌の培養基

培養基の窒素源としてのアミノ酸はアラニン、イソロイシン、グリシン、トレオニン、セリン、トリプトファン、バリン、ヒスチジン、ヒドロキシプロリン、フェニルアラニン、プロリン、メチオニン、ロイシン、アスパラギン酸、グルタミン酸の15種類を用い Czapeck-Dox 培地<sup>2)</sup>の NaNO<sub>3</sub> (2 g/l) の窒素量 (329.6 mg) に等しくなるように各アミノ酸を培地に添加して平板培地を作製した。あらかじめ培養しておいた *Gliocladium catenulatum* (IFO 31225), *G. roseum* (IFO 7063), *G. virens* (IFO 9169), *G. virens* (IAM 5061) の菌叢を直径 5 mm のコルクボーラーで切り抜き、この菌叢ディスクを平板培地の中心に植菌し、生育したコロニーの直径を測定して評価した。また炭素源としての糖類はデキストロース、ガラクトース、イヌリン、ラクトース、マルトース、マンニトール、マンノース、スクロース、キシロースの9種類を用い、Czapeck-Dox 培地の糖成分のところに前述の各種糖類を入れ換え、平板培地を作成した。生育率は

アミノ酸の検定と同様に、*Gliocladium* 菌の菌叢デスクを平板培地の中心に植菌して生育したコロニーの直径を測定して評価した。また他の実験では馬鈴薯煎汁液に各種糖類を添加して、これに *Trichoderma* 菌の菌叢デスクを植菌し、一週間培養して分生孢子数と分生孢子の大きさを測定することによって評価した。

## 2. 拮抗菌の導入媒体

植物病原菌に対して拮抗作用のある *Trichoderma* 菌の導入媒体としては容易に多量入手できる有機質である腐葉土、稲藁（いなわら）、大鋸屑（おがくず）、ピートモス、麩（ふすま）、米糠（こめぬか）などについて適性を調査した。腐葉土と大鋸屑は網目15 mm のふるいにかけ、稲藁とピートモスは5~10 mm の長さに切断したものを使用し、また鉱物質である粘土、鹿沼土などについても導入媒体としての適性を調査した。これらの素材は単独または組み合わせ媒体として直径12 cm のペトリ皿に80%を充填し、121℃で30分間オートクレイブで滅菌後実験に用いた。PSA 平板培地で培養した *T. album* (AHU 9459)、同 (AHU 9465)、*T. hamatum* (TRI-4)、同 (IFO 31291)、*T. harzianum* (Th-58)、同 (IFO 30543)、*T. koningii* (IFO 30544)、*T. polysporum* (IFO 9322)、*T. pseudokoningii* (IFO 30903)、*T. viride* (TS-I-R3)、同 (IAM 5141)、同 (IFO 30498)、*T. lignorum* (TOMOE co.) などの菌叢に滅菌水を注入してラバースマンで掻き取り、菌浮遊液として調製した。この浮遊液をペトリ皿一個あたり10 ml を接種して24~25℃の照明下で2週間培養し、菌叢の生育状態を視覚的に測定して各素材の導入媒体としての適性を評価した。上記の実験は全て3連制で行った。

## 3. 拮抗菌の製剤化と生残率

1) ペレット状粘土製剤：本学生田圃場の黒ボク心土層（立川ローム層）より採集した黒ボク心土（以下これを粘土と記す）を蒸気滅菌し、これに溶解した寒天を0.5%混合攪拌したものに、あらかじめ液体培地に培養しておいた *Trichoderma* 菌の菌マットをホモジナイザーで粉状にして添加した後、十分に練り、直径4~5 mm の棒状にして、これを約1 cm の長さに切断してペレット状の製剤を作成した。また溶解した寒天と共に蒸気滅菌した麩または米糠を混合攪拌したものに、さらに菌マットの粉状試料を加えて攪拌してペレット状の製剤を作成した。これらの製剤化した生物防除剤は3週間室温に保ち、調査日にこれを水に懸濁して、希釈平板法で生残率を調査した。また、これらのペレット状粘土製剤を9週間土壌中に保ち生残率試験を行った。生残率が保存温度によって如何に変化するかを調査するために4℃と24℃について製剤後1週間目と25週間目に希釈平板法によって調査した。

2) 凍結乾燥剤：真空凍結乾燥法は細胞内水分の大部分を蒸発させ、細胞を休止状態に置いて長期生存を図る方法である。供試拮抗菌は *Trichoderma, viride* (TS-I-R3)、*T. lignorum* (TO-

MOE co.), *G. virens* (IFO 9169) であり、製剤化の方法は各種拮抗菌を照明下の PSA 平板培地上で7日間以上培養して充分に分生胞子を作らせた後、これに滅菌水を加えてラバーポリスマンで胞子を掻き取りガーゼで濾過した後、3000 g で20分間遠心分離器にかけて分生胞子を沈澱させ、上澄みを捨て、これに滅菌水を少し加え、胞子濃度を $4.2 \times 10^{14}$  CFU/ml に調製した。製剤化には分散媒（保護剤）として糖類とスキムミルクとグルタミン酸ナトリウムを組み合わせ、これを高圧蒸気滅菌後、各菌浮遊液と混合した。この混合剤の生菌数を希釈平板法で調査した後5 ml ガラスアンプルに入れ、予備凍結した後、真空凍結乾燥を行い製剤化した。これを5°Cの低温庫に5週間保存した後、生残率を希釈平板法で調査した。またスキムミルクは滅菌水90 ml に粉末スキムミルク10 g を溶解したものを原液とし、組み合わせ割合は重量比にした。

3) 試験結果の統計処理：全ての試験区は3連制以上の処理で実施し、そして全ての結果の平均値はダンカン<sup>4)</sup><sup>6)</sup><sup>16)</sup>の多重範囲検定によって分析し、評価した。

## 結 果

### 1. 拮抗菌の菌糸生育及び胞子形成におよぼす培養基の影響

培養基の窒素源とした15種類のアミノ酸についての生育調査の結果は第1表の通りである。表中の数字はコロニーの直径 (mm) を示しており、90 mm はペトリ皿の端に菌糸が到達した状態である。*G. catenulatum* についてはイソロイシン、セリンなどで生育が良く、*G. roseum* についてはロイシン、イソロイシン、グリシン、ヒドロキシプロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸などが良く、*G. virens* (IFO 9169) についてはロイシンが最良であり、次いでヒドロキシプロリン、メチオニンなどが生育が良かった。*G. virens* (IAM 5061) についてはイソロイシン、スレオニン、ヒスチジン、ヒドロキシプロリン、プロリン、メチオニンなどが生育が良かった。これらの結果から、全ての菌株に対して良好な生育をもたらした窒素化合物はイソロイシンであった。

次に培養基の炭素源について調査した結果は第2表の通りである。*G. catenulatum* はガラクトースを資化できず、他の糖類に対しては同程度の利用が認められた。*G. roseum* もガラクトースの利用は弱く、他の糖類に対しては中程度の利用が認められ、*G. virens* 2種類はマルトース以外ではかなり強い利用が認められた。また *T. harzianum* と *T. viride* を用いて、糖の種類によって分生胞子形成数と分生胞子の大きさに相違があるかどうかを調査した結果が第3表である。*T. harzianum* については分生胞子形成数はスクロースが最も多く、ついでラクトース、マンニトール、ガラクトースの順であった。またイヌリン、マルトースなどでは分生胞子形成数は少なかった。分生胞子の大きさについてはスクロース、イヌリンなどは大きく、ガラクトース、マンニト

**Table 1** Radial growth of *Gliocladium spp.* on the media amended with various amino acid as nitrogen source.

Antagonist Nitrogen source	Diameters of radial growth (mm)			
	<i>G. catenulatum</i> (IFO 31225)	<i>G. roseum</i> (IFO 7063)	<i>G. virens</i> (IFO 9169)	<i>G. vires</i> (IFO 5061)
Czapek dogs medium	26.4±2.7a*	30.2±1.5b*	52.1±2.0ab*	90.0±3.1d*
Alanine	29.9±5.8c	31.6±1.4bc	59.0±2.8c	53.7±3.6a
Isoleucine	31.0±2.4d	32.7±6.0c	72.3±3.1e	90.0±2.9d
Glycine	29.0±2.4b	32.0±2.1bc	56.5±1.2b	56.9±2.9a
Threonine	29.2±1.8b	31.7±2.4bc	56.9±1.8bc	90.0±3.7d
Serine	31.3±1.7d	30.1±2.5d	44.8±3.4a	71.3±3.5b
Tryptophane	26.3±2.4a	27.1±2.4a	63.7±0.5cd	77.0±6.7bc
Valine	29.9±1.9c	31.3±1.8bc	66.8±2.4d	88.0±3.3d
Histidine	26.1±2.4a	31.4±2.1bc	58.1±3.3c	90.0±2.3d
Hydroxyproline	24.5±2.9a	32.9±2.8c	75.5±4.5ef	90.0±1.0d
Phenylalanine	26.3±1.8a	30.8±4.3bc	47.5±3.7a	87.8±3.6d
Proline	28.2±2.6a	30.8±0.6bc	69.2±1.1de	90.0±1.4d
Methionine	24.0±3.5a	29.2±1.7d	74.8±1.8ef	90.0±1.8d
Leucine	27.7±1.3a	34.8±1.0d	80.8±1.8g	79.5±2.6c
Aspartic acid	24.0±2.3a	32.3±2.8bc	68.7±3.0de	75.0±5.7b
Glutamic acid	25.1±4.2a	32.9±1.4c	72.2±3.8e	75.0±6.5b

Assay was performed after 5 days of incubation at 25°C. Each value of radial growth is the average of 5 replicate petri dishes.

\* Figures followed by the same letters in each column are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.

**Table 2** Radial growth of *Gliocladium spp.* on the media amended with various sugars as carbon source.

Antagonistes	<i>G. catenulatum</i> (IFO 31225)		<i>G. roseum</i> (IFO 7063)		<i>G. virens</i> (IFO 9169)		<i>G. vires</i> (IAM 5061)	
	2%	4%	2%	4%	2%	4%	2%	4%
Galactose	0.0±0.0a	0.0±0.0a	28.5±1.4b	24.8±2.3a	66.2±3.0cd	42.8±2.2a	67.4±3.0b	63.7±3.2b*
Inulin	41.7±1.4c	47.6±2.7c	43.6±1.8c	66.7±3.3e	67.3±2.7d	68.9±6.3b	69.2±2.1c	88.4±6.5c
Maltose	44.8±2.6d	66.9±3.0d	42.4±2.5c	62.8±2.6d	46.2±2.2a	49.7±1.9a	45.8±2.5a	48.3±2.9a
Mannose	43.7±2.1cd	42.8±1.6b	40.6±1.8c	39.9±2.1b	54.6±2.4b	47.2±4.9a	67.0±2.6b	65.8±2.9b
Sucrose	49.2±2.4e	49.8±2.2c	47.5±1.4d	48.8±2.6c	46.8±4.4a	67.8±5.6b	68.2±3.5b	69.2±4.0b
Xylose	24.9±1.0b	43.2±2.9b	25.8±1.7a	38.8±2.5b	62.3±2.3c	67.7±4.1b	64.4±4.7b	68.9±2.7b

Assay was performed after 10 days of incubation at 25 °C. Radial growth is the average of 5 replicate petri dishes.

\* Figures followed by the same letters in each column are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.

ールなどは小さかった。*T. viride* で分生孢子形成数はスクロースが最も多く，ついでガラクトース，マンニトール，マンノースの順であり，イヌリン，マルトースなどが少なかった。分生孢子の大きさについてはガラクトース，ラクトースなどが大きく，マルトース，マンニトールなど

**Table 3** Growth of *Trichoderma* spp. in the potato decoction amended with various sugars

Antagonistes	<i>T. harzianum</i> (Th-58)		<i>T. viride</i> (IAM 5141)	
Carbon source	Number of conidia ( $\times 10^5$ /ml of medium)	Size of conidia ( $\mu$ )	Number of conidia ( $\times 10^5$ /ml of medium)	Size of conidia ( $\mu$ )
Dextrose	14.0 $\pm$ 4.0b*	3.9 $\pm$ 0.3ab*	9.8 $\pm$ 1.0d*	4.3 $\pm$ 0.3b*
Galactose	19.0 $\pm$ 2.0b	3.2 $\pm$ 0.3a	14.0 $\pm$ 1.4f	4.6 $\pm$ 0.5b
Inulin	0.6 $\pm$ 1.9a	4.1 $\pm$ 0.3b	0.8 $\pm$ 0.2a	4.3 $\pm$ 0.5b
Lactose	32.0 $\pm$ 3.7bc	3.7 $\pm$ 0.3a	7.1 $\pm$ 1.1c	4.6 $\pm$ 0.6b
Maltose	0.8 $\pm$ 1.5a	3.6 $\pm$ 0.4a	3.8 $\pm$ 0.5b	2.5 $\pm$ 0.4a
Mannitol	24.0 $\pm$ 3.6bc	3.3 $\pm$ 0.5a	12.0 $\pm$ 1.4e	2.9 $\pm$ 0.6a
Mannose	19.0 $\pm$ 2.0b	3.9 $\pm$ 0.7ab	10.0 $\pm$ 1.6d	3.9 $\pm$ 0.6b
Sucrose	77.0 $\pm$ 6.0d	4.1 $\pm$ 0.5b	16.0 $\pm$ 1.6g	4.3 $\pm$ 0.6b

Assay was performed after 1 week of incubation at 25°C.

Number of conidia are the mean of eight replicates, and size of conidia are the mean of 160 conidia.

\* Figures followed by the same letters in each column are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.

では小さくなった。分生孢子形成数の多い糖では孢子が大きくなる傾向が認められた。

## 2. 拮抗菌の生育に及ぼす導入媒体の影響

導入媒体として安価に入手できるものを用いて供試した試験結果は第4表の通りであった。ピートモス、大鋸屑、稲藁、腐葉土などの単独およびこれらの素材を組み合わせた素材のいずれでも *Trichoderma* 菌は全く生育しなかった。しかし第4表に示すとおり、麩と米糠を単独で加えた場合には *Trichoderma* 菌の生育が良かった。これらの素材は培養基として使用できるものと考えられた。そこで、麩または米糠と他の素材を組み合わせて拮抗菌の生育状態を調査した。その結果を第5表および第6表に示す。米糠と各種の素材を組み合わせた試験の結果が第5表で、米糠とピートモスとの組み合わせが他の組み合わせに比較して生育がやや劣っている状態が認められ、米糠と腐葉土、米糠と大鋸屑、米糠と稲藁などの組み合わせについては同程度の生育が認められた。また13種類の *Trichoderma* 菌間について見ると *T. album* (AHU 9459), *T. hamatum* (IFO 31291), *T. hamatum* (TRI-4), *T. harzianum* (Th-58), *T. viride* (IAM 5141), 同 (TS-I-R3), *T. lignorum* などは各組み合わせにおいて生育が良く、*T. polysporum*, *T. pseudokonin-gii*, *T. album* (AHU 9465) などは生育が劣っていた。麩と各種の媒体とを組み合わせた生育試験の結果は第6表で、*Trichoderma* 菌13種類全般についてみると、麩とピートモスを組み合わせた場合、生育が劣っている傾向があり、麩と腐葉土、麩と大鋸屑、麩と稲藁などは同程度の生育であった。また *Trichoderma* 菌間について見ると *T. hamatum*, 同 (TRI-4), *T. harzianum* (Th-58), *T. viride* (IAM 5141), 同 (TS-I-R3), *T. lignorum* などはいずれの組み合わせの素材

拮抗菌の製剤化に向けての培養基，導入媒体，および分散媒の検討

Table 4 Growth degree of *Trichoderma* spp. on various carrier media.

carrier media	Rate of mix	<i>T. viride</i> (IAM 5141)	<i>T. viride</i> (IFO 30498)	<i>T. harzianum</i> (IFO 30543)	<i>T. polysporum</i> (IFO 9322)
Peat moss		—*	—	—	—
Sawdust		—	—	—	—
Rice straw		—	—	—	—
Leaf mold		—	—	—	—
Peat moss: Leaf mold	1; 1	—	—	—	—
	1; 2	—	—	—	—
Leaf mold; Kanuma soli	1: 1	—	—	—	—
	2; 1	—	—	—	—
Sawdust; Leaf mold	1; 1	—	—	—	—
	3; 1	—	—	—	—
	8; 1	—	—	—	—
Sawdust; Rice straw	1; 1	—	—	—	—
	1; 2	—	—	—	—
Rice bran		+++	++	++	++
Wheat bran		+++	++	+++	++

Assay was performed after 1 week of incubation at 25°C.

\* (—); Colony of *Trichoderma* spp. was enable grow at all. (+++); The most severe growth. Symbols (— ~ ++ ) of result are the mean of three replicates in twice.

Table 5 Growth degree of antagonistic fungi on various organic carrier media.

Antagonistic fungi	Strains	Rice bran & Peat moss	Rice bran & Leaf mold	Rice bran & Sawdust	Rice bran & Rice straw
<i>Trichoderma album</i>	AHU 9459	+++*	++	++	+++
<i>T. album</i>	AHU 9465	++	++	++	++
<i>T. hamatum</i>	IFO 31291	++	++	++	+++
<i>T. hamatum</i>	TRI-4	++	++	++	+++
<i>T. harzianum</i>	IFO 30543	++	++	++	++
<i>T. harzianum</i>	Th 58	+++	++	+++	+++
<i>T. koningii</i>	IFO 30544	++	++	++	++
<i>T. polysporum</i>	IFO 9322	++	++	+	++
<i>T. pseudokoningii</i>	IFO 30903	++	++	++	++
<i>T. viride</i>	IFO 30498	++	++	++	++
<i>T. viride</i>	IAM 5141	++	+++	++	++
<i>T. viride</i>	TS 1 R3	++	+++	+++	++
<i>T. lignorum</i>	TOMOE	++	+++	+++	++

Assay was performed after incubation for 14 days under light at 25°C.

\* (—); none growth, (+); the most weak growth, (++); the most severe growth. Symbols (— ~ ++ ) of result are the mean of three replicates in twice.

にも良い生育が認められた。

Table 6 Growth degree of antagonistic fungi on various organic carrier media.

Antagonistic fungi	Strains	Wheat bran & Peat moss	Wheat bran & Leaf mold	Wheat bran & Sawdust	Wheat bran & Rice straw
<i>Trichoderma album</i>	AHU 9459	++*	++	++	++
<i>T. album</i>	AHU 9465	+	++	+	++
<i>T. hamatum</i>	IFO 31291	++	+++	+++	+++
<i>T. hamatum</i>	TRI 4	++	+++	+++	+++
<i>T. harzianum</i>	IFO 30543	++	+++	++	+++
<i>T. harzianum</i>	Th 58	+++	+++	+++	+++
<i>T. koningii</i>	IFO 30544	++	++	++	++
<i>T. polysporum</i>	IFO 9322	++	++	+	++
<i>T. pseudokoningii</i>	IFO 30903	++	++	++	+++
<i>T. viride</i>	IFO 30498	++	+++	+++	++
<i>T. viride</i>	IAM 5141	+++	+++	+++	+++
<i>T. viride</i>	TS-1 R3	+++	+++	+++	+++
<i>T. lignorum</i>	TOMOE	+++	+++	+++	+++

Assay was performed after incubation for 14 days under light at 25°C.

\* ( ); none growth, (+); the most weak growth, (++); the most severe growth. Symbols (· ~++) of result are the mean of three replicates in twice.

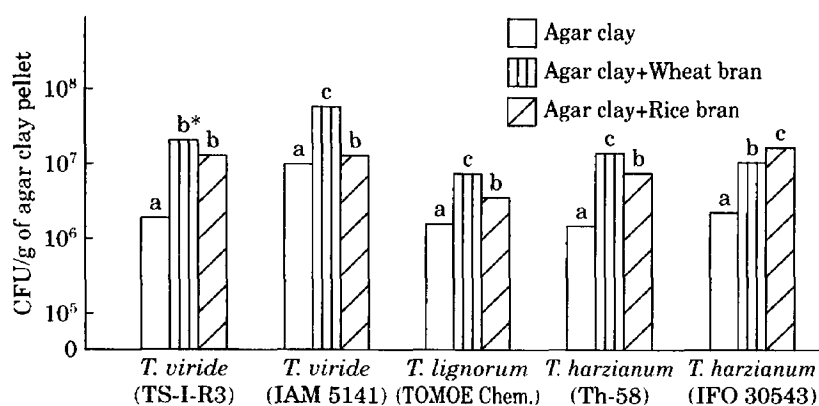
### 3. 拮抗菌の製剤化と生残率の関係

1) ペレット状粘土製剤と生残率：滅菌粘土に拮抗菌を閉じ込めペレット状に製剤化し3週間室温で放置した後の生残率を調査した結果は第1図である。本試験は粘土単独での製剤化と粘土上に有機質である麩や米糠を加えた製剤化による生残率の相違を調査することを目的とした。供試した *Trichoderma* 菌5種類は、いずれも粘土単独よりも有機質を添加したものが生残率が高く、*T. harzianum* (IFO 30543) を除いて粘土に麩を添加したものが最も生残率が高かった。また麩を添加した粘土のペレット状製剤を土壌に混合して9週間後の生残率を調査した結果は第2図である。*T. harzianum* (IFO 30543) を除いて、他の拮抗菌は土壌1g当たり $10^6$ 個以上に生残数が推移した。このペレット状製剤の保存温度による生残率の相違を調査した結果は第7表の通りである。製剤化後1週間の貯蔵において、4°Cと24°Cの大きな差は認められなかったが、25週間目では温度による差は大きく、また菌株による大きな差があることが認められた。

2) 凍結乾燥製剤と生残率：ここでは安価な分散媒を使用して、これに高密度の拮抗菌浮遊液を混入して凍結乾燥製剤化を試みた。供試拮抗菌の種類、各種糖類とスキムミルクとグルタミン酸ナトリウムの組み合わせ割合、および生残率調査の結果は第8表の通りである。試験した3種類の拮抗菌に共通してD-ソルビトールとスキムミルクとグルタミン酸ナトリウムを含む混合製剤が最も生残率が高く、ついでフルクトースとスキムミルクとグルタミン酸ナトリウムの混合製剤、そして蜂蜜とスキムミルクとグルタミン酸ナトリウムの組み合わせ製剤の順に高かった。

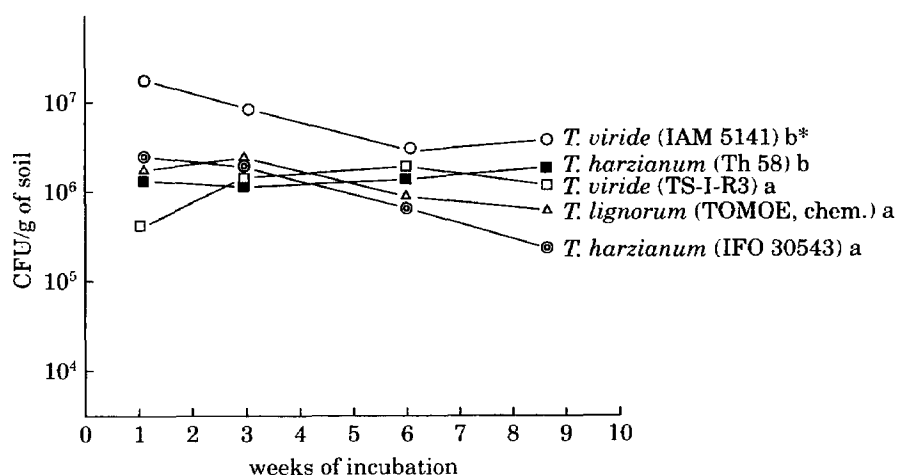


拮抗菌の製剤化に向けての培養基，導入媒体，および分散媒の検討



**Fig. 1** Population density of *Trichoderma* spp. of pellets amended with each carrier medium in soil. Assay was performed after 3 weeks of incubation at room temperature.

\* Figures followed by the same letters in each column are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.



**Fig. 2** Population change in pellets (agar clay wheat bran) that was stored in soil during 9 weeks.

\* Figures followed by the same letters in each column are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.

また3種類の分散媒の組み合わせ中で1種類が欠けても生残率が低下する傾向が認められた。

## 考 察

化学農業に代わる生物防除剤の必要性が説かれて久しいのであるが，未だに満足な成果があがっていないのが現状である。生物防除剤が広く普及されるためには農業生産者の購入意欲が湧く製剤が開発されなければならない。生物防除を実用化するためには製剤化が必要で，まず拮抗菌

**Table 7** Effect of storage temperatures on viability of *Trichoderma spp.* formulated in agar clay pellets containing wheat bran.

<i>Trichoderma spp.</i>	At time of formulation (CFU $\times 10^7$ /g of pellet)	Survival rate (%) of <i>Trichoderma spp.</i> *			
		1 week after formulation		25 weeks after formulation	
		4°C	24°C	4°C	24°C
<i>T. hamatum</i> (TRI-4)	1.8	83 $\pm$ 6b**	89 $\pm$ 13b**	28 $\pm$ 2b**	19 $\pm$ 1c**
<i>T. harzianum</i> (IFO 30543)	2.5	80 $\pm$ 4b	87 $\pm$ 5b	65 $\pm$ 7c	8 $\pm$ 2b
<i>T. harzianum</i> (Th-58)	1.5	79 $\pm$ 4b	82 $\pm$ 12a	78 $\pm$ 15c	16 $\pm$ 2c
<i>T. lignorum</i> (TOMOE Co.)	2.4	104 $\pm$ 8c	88 $\pm$ 12b	78 $\pm$ 17c	28 $\pm$ 4d
<i>T. pseudokoningii</i> (IFO 30903)	17.0	53 $\pm$ 5a	65 $\pm$ 18a	9 $\pm$ 1a	1 $\pm$ 1a
<i>T. viride</i> (IFO 30498)	2.2	95 $\pm$ 7c	86 $\pm$ 9b	68 $\pm$ 8c	36 $\pm$ 4e
<i>T. viride</i> (IAM 5141)	3.4	93 $\pm$ 5bc	85 $\pm$ 5a	82 $\pm$ 8c	58 $\pm$ 3f
<i>T. viride</i> (TS-I R3)	31.5	84 $\pm$ 6b	70 $\pm$ 4a	79 $\pm$ 5c	57 $\pm$ 6f

\* Survival rate is expressed as percentage of the colony forming units per g of pellet assayed at time of formation of pellets.

\*\* Figures followed by the same letters in each column are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.

**Table 8** Survival rate of antagonistic fungi in various dispersion media for lyophilized preservation.

Treatment			Results		
Sugar (%)	Skim milk (%)	Sodium glutamate (%)	Survival rate (%)		
			<i>T. viride</i> (TS-I-R3)	<i>T. lignorum</i> (Tomoe Co.)	<i>G. virens</i> (IFO 9169)
D sorbitol(10)	(10)	(1)	85.3 $\pm$ 1.1e*	85.7 $\pm$ 8.0d*	81.8 $\pm$ 5.1e*
D sorbitol(10)	(0)	(1)	22.9 $\pm$ 1.1c	0.1 $\pm$ 0.1a	24.3 $\pm$ 2.7b
D fructose(10)	(10)	(1)	78.0 $\pm$ 3.3d	65.7 $\pm$ 1.3c	77.0 $\pm$ 4.1d
D glucose(10)	(10)	(1)	10.2 $\pm$ 0.6b	5.7 $\pm$ 0.7a	0.3 $\pm$ 0.1a
Honey(5)	(10)	(1)	3.8a $\pm$ 0.9a	20.0 $\pm$ 1.9b	41.9 $\pm$ 3.7c
Sucrose(0)	(50)	(0)	2.5 $\pm$ 0.4a	15.7 $\pm$ 2.0b	0.1 $\pm$ 0.1a

Population density of conidial suspension were  $4.2 \times 10^{14}$  CFU/ml.

Assay was performed after 5 weeks of preservation at 5°C.

\* Figures followed by the same letters in each column are not significantly different ( $p=0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.

の大量生産を可能にしなければならない。このため最適培養基を探索しなければならない。*Trichoderma* 菌と *Gliocladium* 菌の最適培養基探索の基礎的調査として窒素源についてアミノ酸を供試したが、これは Czapeck-Dox 培地の  $\text{NaNO}_3$  の窒素量に等しくなるように添加した。今後これを2倍量または3倍量にしたら *Gliocladium* 菌の生育がどのように変化するかを調査する必要があるとともに、他の合成培地を適用して窒素成分の要求量を調査する必要がある。本研究の結果は供試した4菌が全てイソロイシンで生育が良好であった。しかし飛び抜けて良い窒素源とは云えなかった。生育は総合的な結果であるからビタミン、ホルモンなどの効果を今後調査

する必要がある。次に炭素源について，これも Czapeck-Dox 培地の糖成分のところを各糖に入れ替えて平板培地にしたもので，供試した *Glilotadium* 4 菌に共通して生育が良かった糖はイースリンであったが，菌種によって糖資化性に差があった。*T. harzianum* と *T. viride* について分生孢子形成数と分生孢子の大きさに対する糖の種類による効果を調べた結果（第3表）は分生孢子形成数はスクロースが大変多く，サイズも大きくなる傾向が認められた。このように形成数と大きさが正比例しているのは興味深い。*Trichoderma* 菌に分生孢子を多量に形成させる必要があるときは炭素源としてスクロースを添加すれば良い。

導入媒体の適性素材を探索するために有機質としてピートモス，腐葉土，大鋸屑，稲藁，麩，米糠を，鉱物質として粘土，鹿沼土などを供試した。*Trichoderma* 菌を接種して培養した際にはピートモス，腐葉土，大鋸屑，稲藁，粘土，鹿沼土については単独でも，これらを組み合わせた場合のいずれでも生育は認められなかった。しかし，麩および米糠では単独で旺盛な生育が認められたので，これらは培養基として適用できると考えられる。*Trichoderma* 菌は半寄生菌であるが，有機質に対しては選択性があると考えられる。単独で生育できる素材と単独で生育できない素材を組み合わせで培養試験を行った結果（第5表，第6表），ピートモスを除いた他の素材については良い生育が認められた。以上の結果から導入媒体としては単独で生育できる素材と腐葉土，大鋸屑，稲藁などの有機質を組み合わせたもので充分であり，糖やアミノ酸の添加は必要ない。

製剤化と生残率について粘土と寒天を導入媒体としてペレット状製剤を作成して室温で3週間放置した結果（第1図），これに有機質の麩や米糠を添加したものは生残率が高かった。今後，鉱物質や寒天を導入媒体にするときは単独で生育できる有機質の添加が必須要件である。また土壌中に混入したとき（第2図）も長期に拮抗菌を高密度に維持して行くためにはこの要件が重要であると考えられる。ペレット状粘土製剤の貯蔵温度差による生残率について調査した結果（第7表）は予想通り低温で高かったので，生物防除剤は生残率を落とさないためには低温貯蔵が必要である。

凍結乾燥製剤に適用する分散媒は通常高分子物質と低分子物質の組み合わせで作成する。本研究では高分子物質としてスキムミルクを，低分子物質として各種糖類とグルタミン酸ナトリウムを用いた。この低分子物質は乾燥試料の最終水分量が過度に低くならないように水分緩衝剤として働いている。糸状菌の菌糸は凍結による損傷を受け易いので孢子形成菌株が適している。また孢子が十分に成熟していることが必要である。本研究における分散媒の組み合わせと生残率の試験結果（第8表）は高分子物質と低分子物質をバランス良く組み合わせた分散媒の方が優れていることを示している。参考のために試験した蜂蜜は多糖類の他にタンパク質など糖以外の様々な物質が含まれており，生残率に与える影響が注目されたが結果はあまり高い生残率を示さず，複雑な組成を持つ分散媒が必ずしも良い結果をもたらすわけではない事を示していた。

本研究の概要は日本農薬学会および日本植物病理学会で発表した。

## 摘 要

生物防除剤の実用化には拮抗菌の大量生産が必要であり、これには最適の培養基や導入媒体を開発しなければならず、貯蔵、保存、運搬、そして取扱い易さのためには製剤化しなければならない。そこで、拮抗菌 *Gliocladium* 4種類について15種類のアミノ酸を調査した結果、窒素源としてイソロイシンが最も適していた。培地基質の炭素源について上記4種類の菌と6種類の糖を調査した結果、イヌリンが適していた。*Trichoderma* 菌2種類に対する8種類の糖の調査ではスクロースが最適であった。また導入媒体として各種の素材について13種類の *Trichoderma* 菌で調査した結果、米糠および麩と腐葉土、大鋸屑、稲藁など、それぞれの組み合わせが適していた。拮抗菌の製剤化と生残率について、*Trichoderma* 菌5種類で調査した結果、粘土に有機質を添加したペレット状製剤が高い生残率を示し、また凍結乾燥製剤について、*Trichoderma* 2種類と *Gliocladium* 1種類を調査した結果、分散媒としてD-ソルビトールとスキムミルクとグルタミン酸ナトリウムの組み合わせの製剤が3菌株に共通して高い生残率を示し最適の分散媒であった。

## 引 用 文 献

- 1) Backman, P. A. and R. Rodriguez-Kabana. 1975. A System for the Growth and Delivery of Biological Control Agents to the soil. *Phytopathology* **65**: 819-821.
- 2) Conway, K. E., Fischer, C. G. and Wotes, J. E. 1982. A new technique for delivery of biological agents with germinated vegetable seed. *Phytopathology* **72**: 987.
- 3) 土壌微生物研究会編, 1975, 土壌微生物実験法 p. 434. 養賢堂
- 4) Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* **11**: 1-42.
- 5) Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D., and Connick, W. J. Jr. 1985. Encapsulation of potential Biocontrol Agents in an Alginate-clay Matrix. *Phytopathology* **75**: 774-777.
- 6) Harter, H. L. 1960. Critical values for Duncan's new multiple range test. *Biometrics* **16**: 671-685.
- 7) Herman, G. E., Tayler, A. G., and Stasz, T. E. 1989. Combining Effective Strains of *Trichoderma harzianum* and Solid Matrix Priming to Improve Biological Seed Treatments. *Plant Disease* **73**: 631-637.
- 8) Huang, J. W., and Kuhlman, E. G. 1991. Mechanisms Inhibiting Damping-off Pathogens of Slash Pine Seedlings with a formulated Soil Amendment. *Phytopathology* **81**: 171-177.
- 9) Kelley, W. D. 1976. Evaluation of *Trichoderma harzianum* Impregnated clay Granules as a Biocontrol for *Phytophthora cinnamomi* Causing Damping-off of Pine Seedlings. *Phytopathology* **66**: 1023-1027.
- 10) Knudsen, G. R., and Bin, Li. 1990. Effects of Temperature, Soil Moisture, and Wheat Bran on Growth of *Trichoderma harzianum* from Alginate Pellets. *Phytopathology* **80**: 724-727.
- 11) Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. 1984. A New Approach to Stimulate Population proliferation of *Trichoderma* species and Other Potential Biocontrol fungi Introduced into Natural Soil. *Phytopathology* **74**: 1240-1244.
- 12) Lewis, J. A., and Papavizas, G. C. 1985. Characteristics of Alginate pellets Formulated with *Trichoder-*

- ma* and *Gliocladium* and their Effect on Proliferation of the Fungi in soil. *Plant Pathology* **34**: 571-577.
- 13) Lewis, J. A., and G. C. Papavizas. 1984. Effect of the fumigant Metham on *Trichoderma* spp. *Can. J. Microbiol.* **30**: 739-745.
- 14) Lutchmeanh, R. S. and R. C. Cooke, 1985. Pelleting of Seed with the Antagonist *Pythium oligandrum* for Biological Control of Damping off. *Plant Pathology* **34**: 528-531.
- 15) Marois, J. J., and Locke, J. C. 1985. Population Dynamics of *Trichoderma viride* in Steamed Plant Growth Medium. *Phytopathology* **75**: 115-118.
- 16) 松本和夫, 1979. 薬剤試験成績における効果(処理平均値)の多重比較-Duncan's multiple range test について—植物防疫第33巻第4号30-35.
- 17) 中沢憲夫, 松中謙次郎, 田中弥兵, 1978. リンゴ白紋羽病菌に対するフッティレイド及びトリコデルマの効果。北日本病中研報**29**: 51.
- 18) 大島俊市, 1964. *Trichoderma lignorum* の製剤方法について。日本植物病理学会報第29巻第2号94.
- 19) Papavizas, G. C., Fravel, D. R., and Lewis, J. A. 1987. Proliferation of *Talaromyces flavus* in Soil and Survival in Alginate Pellets. *Phytopathology* **77**: 131-136.
- 20) Papavizas, G. C., M. T. Dum, J. A. Lewis, and J. Beagle-Ristaino, 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* **74**: 1171-1175.